Aus dem Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Coper

DIE BEEINFLUSSUNG DER NAD-KINASE DER RATTENLEBER DURCH ANTIMETABOLITEN DES NIKOTINAMID UND DURCH NAD - ANALOGE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Oberdisse
geb. Nieling
aus Brandenburg

1970

Aus dem Institut für Neuropsychopharmakologie
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Helmut Coper

DIE BEEINFLUSSUNG DER NAD-KINASE DER RATTENLEBER DURCH ANTIMETABOLITEN DES NIKOTINAMID UND DURCH NAD - ANALOGE

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ursula Oberdisse
geb. Nieling
aus Brandenburg

Dekan: Professor Dr. med. Herbert LAX
Referent: Professor Dr. med. Helmut COPER
Korreferent: Professor Dr. med. Diether NEUBERT

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 15. 6. 1970

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Einleitung 3

Methoden

1. Anreicherung der NAD-Kinase 5
2. Bestimmung des Proteingehaltes der NAD-Kinase-präparation 6
3. Standardinkubationsansatz 7
4. Auswertung 9
5. Identifizierung des 6-ANADP durch Chromatographie; Phosphatbestimmung 11
6. Bestimmung der Michaelis- und Hemmungskonstanten 12

Ergebnisse

I. Eigenschaften der NAD-Kinase 14

1. Abhängigkeit vom pH-Wert 14
2. Abhängigkeit von der NAD-Konzentration 14
3. Abhängigkeit von der ATP-Konzentration 16

a) Phosphorylierung von NAD durch UTP und GTP 16

II. Phosphorylierung von NAD in Anwesenheit der Antimetaboliten 3-AP, 6-AN und der Analogen 3-APAD, 6-ANAD und Thio-NAD 19

1. 3-AP und 6-AN 19
2a. 3-APAD 21
2b. 6-ANAD 23
2c. Thio-NAD 25

Diskussion 27

Zusammenfassung 30

Literaturverzeichnis 33

Abkürzungen 32

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546513_0072

EINLEITUNG

Die Pyridinnucleotide NAD(H_2) und NADP(H_2) sind Coenzyme zahlreicher Oxydoreduktasen und katalysieren die reversible Übertragung des Wasserstoffes auf verschiedene Substrate des Energiestoffwechsels, der Fettsäuresynthese etc.. NADP(H_2) unterscheidet sich vom NAD(H_2) durch ein zusätzliches Phosphatmolekül. Dieses wird in einer Mg^{++}-abhängigen Ein-Schritt-Reaktion durch die NAD-Kinase (E.C. 2.7.1.23) mit der Ribose in 2'-Stellung verknüpft. Das für die Phosphorylierung benötigte energiereiche Phosphat wird aus ATP gewonnen. Die Reaktion verläuft nach nachstehender schematischer Darstellung:

$$NAD^+ + ATP \xrightarrow[Mg^{++}]{\text{NAD-Kinase}} NADP^+ + ADP \qquad (27)$$

Nach den Untersuchungen von MANN und QUASTEL (30), HANDLER und KLEIN (20) sowie McILWAIN und RODNIGHT (32) wird NAD durch die NAD-Glycohydrolase (E.C. 3.2.2.5) in NA und ARPPR gespalten. Die Hydrolyse des NADP erfolgt nach dem gleichen Prinzip [NAD(P)-Glycohydrolase (E.C. 3.2.2.6)] (26).
Dieses Ferment besitzt neben seiner hydrolytischen noch eine transferierende Eigenschaft, durch die NA wieder auf ARPPR(P) übertragen wird. Durch die geringe Spezifität des Enzyms können auch dem NA ähnlich strukturierte Verbindungen wie 3-AP, 6-AN u.a. gegen NA ausgetauscht werden (7, 8, 9, 21, 41). Die dadurch entstehenden NAD(P)-Analogen sind für verschiedene Oxydoreduktasen schlechtere Wasserstoffcarrier als NAD(P) (COPER und NEUBERT u.a. 14, 16).
Wie BRUNNEMANN und COPER sowie HERKEN und NEUHOFF u.a. (7, 13, 21) feststellten, werden nach Applikation von 3-AP und 6-AN in den Organen von Ratten mehr NADP-Analoge als NAD-Analoge

synthetisiert.

Durch in-vitro-Versuche, bei denen prinzipiell die gleichen Ergebnisse gefunden wurden, haben BRUNNEMANN und COPER (7) diesen Effekt zu erklären versucht. Sowohl NAD als auch NADP werden durch die Glycohydrolase gespalten. Die Reaktion ist durch NA hemmbar. Dabei ist die Konzentration an NA, die für die Hemmung der Hydrolyse des NADP benötigt wird, ca. 10mal geringer als für NAD.

Unter den von ihnen gewählten Bedingungen trat schon durch das bei der Spaltung frei werdende NA eine Hemmung der Hydrolyse des NADP auf. Dabei blieb die Aktivität der Transferase unbeeinflußt. Auf diese Weise kann bei hoher Konzentration des Antimetaboliten NA im nicht hydrolysierten NADP weitgehend verdrängt werden. Da die bei der Hydrolyse von NAD entstehende NA-Konzentration nicht ausreicht, um die Geschwindigkeit der Spaltung zu beeinflussen, kann auch kaum ein Austausch stattfinden. Doch ist noch ungeklärt, ob die in vitro höhere NADP-Analogenbildung auch in vivo so zu erklären ist, denn es wäre denkbar, daß die NAD-Analogen schneller als NAD durch die NAD-Kinase phosphorylliert werden.

Aus diesem Grunde sind in der vorliegenden Arbeit folgende Untersuchungen durchgeführt worden.

I. Nachprüfung der in der Literatur beschriebenen Eigenschaften der NAD-Kinase der Rattenleber hinsichtlich der

1. Abhängigkeit vom pH-Wert
2. Abhängigkeit von der NAD-Konzentration
3. Abhängigkeit von der ATP-Konzentration

3a. Phosphorylierung von NAD durch UTP und GTP

II. Phosphorylierung von NAD in Anwesenheit von

1. 3-AP und 6-AN

2a. 3-APAD

2b. 6-ANAD

2c. Thio-NAD.

METHODEN

1. Anreicherung der NAD-Kinase

Da sich nach den Untersuchungen von NEMCHINSKAYA (34) die höchste NAD-Kinaseaktivität im Hyaloplasma der Zelle befindet, diente in der vorliegenden Arbeit diese Zellfraktion der Rattenleber als Enzymquelle. Die Anreicherung des Fermentes erfolgte bei 0 - 5°C Raumtemperatur in Anlehnung an die Angaben von WANG und KAPLAN (40). Die einzelnen Schritte sind im Folgenden geschildert.

6 ca. 130 - 160 g schwere Albinoratten wurden dekapitiert, die Lebern herauspräpariert und sofort in 0,25 M eiskalte Saccharoselösung gegeben. Im Verhältnis Lebergewicht zu Saccharoselösung von 1 : 2 ließen sich die Organe in einem Potter-Elvehjem-Plexiglashomogenisator unter Kühlung im Eisbad gut homogenisieren. Durch Zentrifugieren des Homogenates in der Phywe Eispirouette bei 10.000 g und des daraus gewonnenen Überstandes in der Ultrazentrifuge (Beckman Spinco L 50, Rotor 40) bei 100.000 g ca. 60 Min. wurde ein klarer, partikelfreier Supernatant erhalten, aus dem ein Acetontrockenpulver hergestellt wurde (12).
Dazu mußten in einem gesonderten Arbeitsgang Aceton und Aether gereinigt werden. Aceton wird über Nacht mit wasserfreiem Kaliumcarbonat getrocknet und anschließend destilliert. Die Trocknung des Aethers erfolgte durch Einpressen von metallischem Natriumdraht. Das Natrium reagiert mit Wasser unter Bildung von Natriumhydroxyd und Wasserstoff. Zusätzlich fällt Na^+ die im Aether enthaltenen sauren Peroxyde (36), die das Ferment durch Oxydation inaktivieren würden. Durch anschließende Destillation ließ sich das Natrium wieder entfernen.
Unter Rühren werden ca. 100 ml der Mischung aus dem Hyaloplasma

und Saccharose in ca. 1,5 Liter eiskaltes Aceton (-20°C) gegeben. Dabei setzt sich am Boden des Gefäßes ein flockiger Niederschlag ab, der das Enzymprotein enthält. Nach Abgießen des Überstandes wird das Sediment erneut mit Aceton aufgeschwemmt, der Rückstand abfiltriert und das restliche Aceton über eine an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossene Nutsche abgesaugt. Mehrmaliges Waschen mit Aceton und Trocknen des Niederschlages mit Aether schließen sich an. Das zurückbleibende Pulver ist in der Kälte unter Luftabschluß ohne Aktivitätsverlust 48 Std. haltbar.
6 g dieses Trockenpulvers werden in 70 ml 0,02 M eiskalter $KHCO_3$-Lösung aufgenommen und die Suspension nach 1 Stunde Extraktion ca. 10 Min. in der Phywe-Eispirouette bei 10.000 g zentrifugiert. Einbringen von 0,2 %iger Protaminsulfatlösung in 0,02 M Trispuffer pH 7,4 in den Überstand fällt das enzymenthaltende Protein, das durch erneutes Zentrifugieren bei 2.000 g gesammelt und mit 20 ml 0,2 M Acetatpuffer pH 5 extrahiert wird. Nach Abzentrifugieren der ungelösten Bestandteile bei 2.000 g ist im Überstand das angereicherte Ferment enthalten. Eine weitere Reinigung des Enzyms durch Bindung an Aluminium C_γ-Gel und anschließende Fällung mit $(NH_2)_2SO_4$ erhöht zwar die spezifische Aktivität, doch ist der Gesamtverlust erheblich. Daher wurden die Versuche mit dem Acetatpufferextrakt durchgeführt.

2. Bestimmung des Proteingehaltes der NAD-Kinasepräparation

Die Bestimmung des Proteins der Fermentlösung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (29). Sie erlaubt durch kolorimetrische Messung der Farbintensität eines blau-violetten Cu-Protein-Komplexes, den unbekannten Proteingehalt im Vergleich mit einer Standardlösung zu ermitteln. Als Eichlösung diente eine Serumalbuminlösung mit einem Proteingehalt von 10 mg/ml, die entsprechend verdünnt wurde. Die Meßwerte des Standards

dienten als Eichkurve, nach der der Proteingehalt des Acetatpufferextraktes bestimmt wurde (Abb. 1). Bei geeigneter Verdünnung der Fermentpräparate (1 : 100) lagen die Meßwerte auf der Eichkurve. Zur genauen Ermittlung des Proteingehaltes der einzelnen Aufarbeitungen wurden 0,25, 0,50 und 1 ml vom verdünnten Extrakt in je ein Reagenzglas gegeben, mit 1 ml einer alkalischen Kupfersulfat-Kalium-Natrium-Tartrat-Lösung versetzt, ad 10 ml mit aqua dest. aufgefüllt und anschließend 0,1 ml Folinreagenz zupipettiert. Nach ca. 45 Min. erfolgte die Messung der Extinktion des Cu-Proteinkomplexes mit einem Beckman Spektrophotometer Modell DU bei einer Wellenlänge von 750 mμ.

Tabelle 1

Beispiel einer Proteinbestimmung

Acetatpufferextr. Verd. 1 : 200	$E_{750\ m\mu}$	aus der Eichkurve ermittelter Proteingehalt in μg	μg/ml	mg Protein/ ml Acetatpufferextrakt
0,25 ml	35	11	44	
0,50 ml	50	22	44	8,9
1,00 ml	75	46	46	

Unter den gewählten Bedingungen der Aufarbeitung betrug der Proteingehalt der Extrakte (n = 28) im Mittel 10,2 mg/ml.

3. Standardinkubationsansatz

Sofern nicht anders angegeben, enthielt der Inkubationsansatz stets

NAD	39,0 Mikromole
ATP	29,7 Mikromole
$MgCl_2$	16,2 Mikromole

in 4,0 ml 0,5 M Trispuffer pH 7,4 gelöst und wurde mit 1 ml

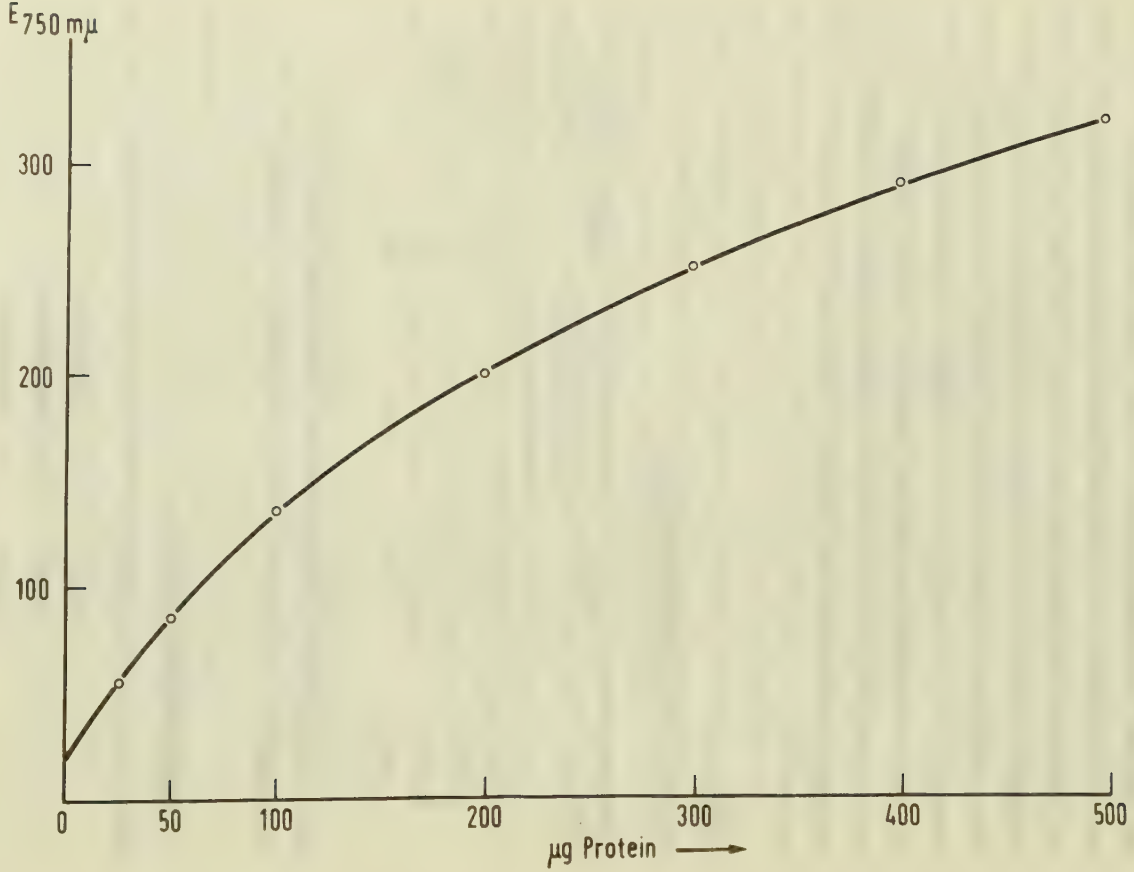


Abb. 1 Beispiel einer Eichkurve für die Proteinbestimmung

Acetatpufferextrakt im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Sofort nach Zugabe des Enzyms sowie nach 30, 60, 90 und 120 Min. wurden je 1 ml Lösung entnommen, in ein Zentrifugenglas gegeben und für ca. 1 Min. in siedendes Wasser getaucht, um die Reaktion zu stoppen. Nach Abzentrifugieren des denaturierten Eiweißes (10 Min. bei 2.400 U/Min.) lassen sich aus dem Überstand mit Hilfe einer Fermentreaktion, bei der NADP reduziert wird, das gebildete NADP bzw. die NADP-Analogen ermitteln.

$$\text{NADP} + \text{Gl-6-ph.} \xrightarrow[\text{Dehydrogenase}]{\text{Glucose-6-ph.}} \text{Gluconsäure-6-ph.} + \text{NADPH} + \text{H}$$

Das bei dieser Reaktion entstehende NADPH hat ein 2. Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 mμ. Aus dem Extinktionsanstieg bei dieser Wellenlänge kann die vorhandene NADP-Menge aus folgendem Meßansatz ermittelt werden.

Meßansatz:

0,5 ml Überstand
0,1 ml (0,912 mg) Glucose-6-phosphat
ad 3,0 ml mit 0,2 M Trispuffer pH 7,4

Die Bestimmung von 3-APADP bzw. Thio-NADP neben NADP im Inkubationsansatz erfolgte durch Messung der Extinktion bei 400 mμ. Bei dieser Wellenlänge besitzt NADPH im Gegensatz zu 3-$APADPH_2$ und Thio-$NADPH_2$ keine Absorption mehr.

4. Auswertung

Für die monochromatische Lichtabsorption gilt das Lambert-Beersche Gesetz

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

In dieser Formel bedeuten E die gemessene Extinktionsdifferenz, ε den molaren dekadischen Absorptionskoeffizienten, c die Konzentration der Substanz und d den Küvettendurchmesser in cm.

Für NADPH beträgt der Extinktionskoeffizient bei 340 mμ $6,2 \cdot 10^6$ cm^2/mol. Unter Berücksichtigung des Volumens des Meßansatzes (3 ml), des Inkubationsüberstandes (0,5 ml) und des Küvettendurchmessers 1 cm ergab sich nach c (unbekannte Konzentration) aufgelöst, folgende Formel.

$$c = \frac{E_{340} \cdot 3 \cdot 10^{-6}}{6,2 \cdot 0,5}$$

Um die gebildete NADP-Menge in mol/mg Prot./Std. angeben zu können, mußte durch die eingesetzte Proteinmenge dividiert werden. Durch Zusammenfassen der konstanten Faktoren ließ sich die Formel vereinfachen.

$$NADP_{(mol)} = \frac{4,82 \cdot E_{340} \cdot 10^{-6}}{\text{mg Protein}}$$

Die Berechnung von 3-APADP erfolgte nach der gleichen Formel. Es mußte jedoch die spezifische Extinktion des hydrierten Analogen berücksichtigt werden. Sie beträgt bei 400 mμ $2,4 \cdot 10^6$ cm^2/mol. Dadurch ergab sich für 3-APADP

$$c = \frac{E_{400} \cdot 3 \cdot 10^{-6}}{2,4 \cdot 0,5 \cdot \text{mg Protein}}$$

oder zusammengefaßt

$$3\text{-}APADP_{(mol)} = \frac{12,5 \cdot E_{400} \cdot 10^{-6}}{\text{mg Protein}}$$

Für die Berechnung des Thio-NADP wurde die gleiche Formel verwandt unter Berücksichtigung der spezifischen Extinktion des Analogen bei 400 mμ von $E = 11,7 \cdot 10^6 \cdot cm^2/mol$.

5. Identifizierung des 6-ANADP durch Chromatographie

Die 6-AN-Analogen des NAD und NADP lassen sich durch keine Dehydrogenase reduzieren und sind deshalb spektrophotometrisch vom NADP und auch untereinander nicht zu differenzieren. Daher wurde versucht, mit Hilfe chromatographischer Verfahren eine eventuelle 6-ANADP-Bildung durch die NAD-Kinase nachzuweisen. Die Trennung der im Inkubationsansatz vorhandenen Substanzen erfolgte auf Whatman-Papier Nr. 1 mit einem Lösungsgemisch von:

Isobuttersäure - H_2O - NH_3 im Verhältnis 66 : 33 : 1.

Auf die Startlinie wurden der Inkubationsüberstand und die Vergleichssubstanzen nebeneinander aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 16 Std. hatten sich die Banden nur ungenügend getrennt. Erst durch Rechromatographie gelang eine befriedigende Auftrennung. Die Lokalisierung der getrennten Fraktionen erfolgte mit Hilfe des Photoprint-Verfahrens nach MARKHAM und SMITH (31) und die direkte Markierung der UV-Licht-absorbierenden Flecken auf dem Papier über einer UV-Lampe nach HOLIDAY und JOHNSON (24).

Phosphatbestimmung

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes der zu analysierenden Substanzen folgte der Methode von BERENBLUM und CHAIN (4). Sie beruht auf der vollständigen Extrahierbarkeit der Phosphormolybdänsäure mit Isobutanol. Durch Veraschen mit 1 ml 12 n Perchlorsäure bei 180°C läßt sich das in organischen Verbindungen enthaltene Phosphat in anorganisches überführen. Das farblose Veraschungsprodukt wird nach Spülen in einem Scheidetrichter mit 2,5 ml 5 %iger Ammoniummolybdatlösung versetzt. Anschließend erfolgt Auffüllen mit Wasser auf 10 ml

und Zugabe von 10 ml Isobutanol. Nach 2 Min. Schütteln wird die wässrige Phase verworfen und die das Phosphat enthaltende alkoholische Phase 2mal mit je 5 ml 1 n Schwefelsäure gewaschen. Durch 30 Sekunden langes Schütteln mit 15 ml verdünnter Zinn-2-chloridlösung bildet sich durch Reduktion der Molybdänsäure eine blaue Komplexverbindung. Nach Ablassen der wässrigen Phase werden die blaugefärbten Lösungen quantitativ in Meßkolben mit Äthanol gespült und auf 25 ml aufgefüllt. Als Eichwert dient eine Lösung von primärem Kaliumphosphat (KH_2PO_4) mit einem Phosphatgehalt von 1 μmol/ml. Die Extinktionen der Lösungen wurden an einem Beckman Spektrophotometer Modell DU bei 725 mμ gemessen.

6. Bestimmung der Michaelis- und Hemmungskonstanten

1930 haben MICHAELIS und MENTEN (33) als Maß für die Affinität eines Enzyms zum Substrat eine Konstante K_m abgeleitet unter der Voraussetzung, daß für die Katalyse durch ein Ferment die Bildung eines Enzym-Substratkomplexes notwendig sei. Dieses Zwischenprodukt soll in das freie Enzym und das Reaktionsprodukt mit einer Geschwindigkeit zerfallen, die der Enzym-Substratkomplexkonzentration proportional ist. Demnach stellt K_m formal die Dissoziationskonstante des Enzym-Substratkomplexes dar.

$$K_m = \frac{[S] \cdot [E]}{[ES]}$$

In dieser Formel bedeuten $[S]$ die Konzentrationen des Substrates, $[E]$ des Enzyms und $[ES]$ des Enzym-Substratkomplexes. Bei Reaktionen, an denen mehrere Substrate beteiligt sind, kann sie als Zusammenfassung mehrerer Einzelkonstanten aufgefaßt werden. K_m gibt die Substratkonzentration an, bei der unter den gewählten Bedingungen die Reaktion mit halbmaximaler

Geschwindigkeit abläuft. Nach der von LINEWEAVER und BURK (28) angegebenen Methode läßt sich die Konstante aus einem 1/V - 1/S Diagramm bestimmen. In den Versuchen wurde die Konzentration der Substanz, deren Konstante bestimmt werden sollte, unter Beibehaltung der übrigen Versuchsbedingungen variiert. Durch graphische Darstellung der reziproken Geschwindigkeit der Reaktion (1/V) in Abhängigkeit von der reziproken Substratkonzentration (1/S) ergibt sich eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Abszisse im Punkte $-1/K_m$ und mit der Ordinate im Punkte $1/V_{max}$ liegen.
Aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm läßt sich auch der Hemmungstyp bestimmen. Bei der Substrat- oder Überschußhemmung stellt das Substrat selbst den Inhibitor dar. Im Lineweaver-Burk-Diagramm nehmen bei niedrigen 1/S-Werten die 1/V-Werte wieder zu, und die Gerade wird zu einer Kurve.
Die Bestimmung der Hemmungskonstanten erfolgte nach der Methode von AUGUSTINSSON (3). In den Versuchen dazu wurde die Konzentration des Inhibitors variiert. Die Werte im $V/V' [I]$-Diagramm eingetragen (V = NADP - Bildung ohne, V' = NADP - Bildung mit Inhibitorzusatz, $[I]$ = Inhibitorkonzentration) ergeben eine Gerade, die bei kompetitiver Hemmung die Steigung K_m/K_i ($[S] + K_m$) und bei nicht kompetitiver Hemmung die Steigung $1/K_i$ aufweist.
(K_m = Michaeliskonstante des Substrats, $[S]$ = Substratkonzentration, K_i = Hemmungskonstante). Da die Art der Hemmung bekannt sein muß, erfolgte die Bestimmung der Hemmungskonstanten für 3-APAD, 6-ANAD und Thio-NAD unter der Annahme der kompetitiven Hemmung.
Nach neueren Untersuchungen von APPS (2) an Taubenleberenzym ist der kompetitive Hemmungstyp für 3-APAD und Thio-NAD gesichert.

E R G E B N I S S E

I. Eigenschaften der NAD-Kinase

Um die Versuche unter optimalen Bedingungen durchführen zu können, sollten zunächst die Eigenschaften dieses Enzyms näher untersucht werden.

1. Abhängigkeit vom pH-Wert

Die Standardinkubationsansätze wurden mit 0,5 M Trispuffer über einen pH-Bereich von 6,6 bis 8,0 inkubiert. Die gebildete NADP-Menge, in Abhängigkeit vom pH-Wert graphisch dargestellt, ergibt eine Kurve, deren Maximum zwischen pH 7,4 und 7,6 liegt. Bei niederen und höheren Wasserstoffionenkonzentrationen nimmt die Aktivität des Fermentes ab. (Abb. 2). Das pH-Optimum der Rattenleber NAD-Kinase stimmt demnach mit dem in der Literatur für Taubenleberenzym beschriebenen gut überein (1). In mehreren Versuchen (n = 10) betrug die synthetisierte NADP-Menge bei pH 7,4 im Mittel $1,43 \cdot 10^{-7}$ mol/mg Prot./Std..

2. Abhängigkeit von der NAD-Konzentration

In den folgenden Experimenten wurden die ATP- und $MgCl_2$-Konzentration konstant gehalten und die NAD-Konzentration variiert. Die graphische Darstellung der Geschwindigkeit der NADP-Synthese in Abhängigkeit von der Substratkonzentration erfolgte in einem 1/V - 1/S-Diagramm nach der von Lineweaver und Burk angegebenen Methode (Abb. 3). Für NAD ergibt sich aus der Darstellung ein K_m-Wert von 0,93 mM. Dieser Wert ließ sich reproduzieren und stimmt mit den Ergebnissen von OKA und FIELD (35) gut überein.

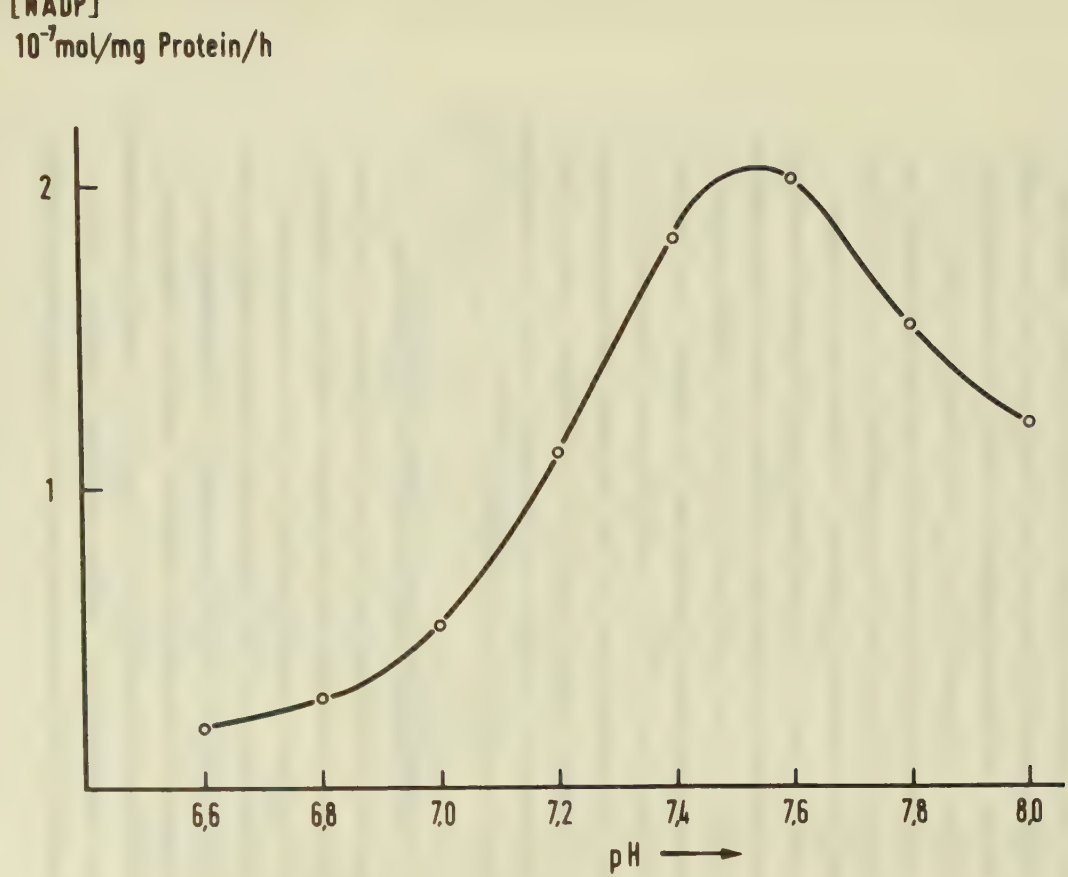


Abb. 2 Aktivität der Rattenleber-NAD-Kinase in Abhängigkeit von der H^+-Ionenkonzentration

3. Abhängigkeit von der ATP-Konzentration

Da die NAD-Kinase zur Synthese des NADP zwei Substrate benötigt, ist ihre enzymatische Aktivität neben der NAD-Konzentration auch noch von der ATP-Konzentration abhängig. Bei gleichbleibendem Einsatz von NAD und $MgCl_2$ wurde die ATP-Konzentration variiert. Die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonzentration wurde im Lineweaver-Burk-Diagramm dargestellt. Der K_m-Wert beträgt 1,2 mM.
Im Gegensatz zum NAD tritt bei höheren Konzentrationen von ATP eine Hemmung der Fermentaktivität auf. Im 1/V - 1/S-Diagramm nehmen bei niederen 1/S-Werten die 1/V-Werte wieder zu (Abb. 3). Dieser Effekt könnte für eine Überschußhemmung des ATP sprechen (18). Nach neueren Untersuchungen von APPS (2) an Taubenlebern ist ein ATP-Metall-Komplex das phosphatliefernde Substrat der NAD-Kinase. Das optimale Verhältnis von Mg^{++}/ATP beträgt in seinen Versuchen 3 : 1 und ist unabhängig vom pH. Mit steigender ATP-Konzentration wird dieses Verhältnis gestört und die Reaktion gehemmt. Der Hemmungstyp konnte bisher nicht geklärt werden. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Mischform.

a) Phosphorylierung von NAD durch UTP und GTP

Die Nucleosidtriphosphate UTP und GTP gehören zu den energiereichen Phosphaten des Organismus. UTP stellt im Stoffwechsel das allgemeine Coenzym für die Übertragung von Glycosylresten dar (39). Durch seine Katalyse erfolgt u.a. die Synthese der Di- und Polysaccharide, die Umwandlung von Galaktose in Glucose und umgekehrt, sowie die Übertragung des Gluconsäurerestes. GTP dagegen ist - soweit bisher bekannt - als Coferment nur an wenigen speziellen Reaktionen wie der Aminierung von Inosinsäure und an der Eiweißsynthese beteiligt.

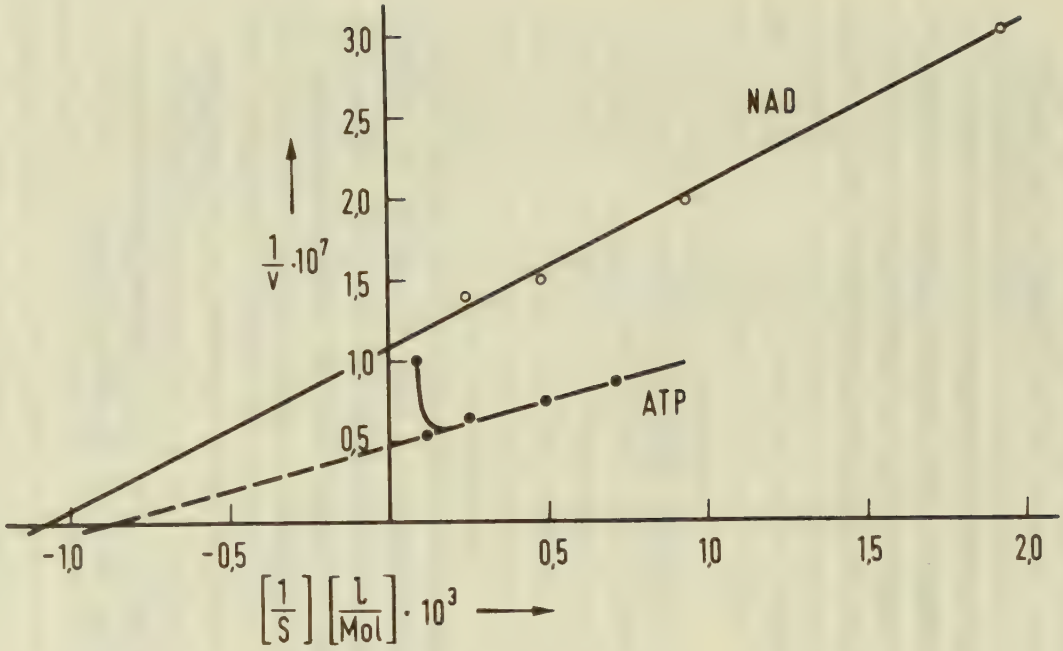


Abb. 3 Bestimmung der Michaeliskonstanten der Substrate ATP und NAD für die Rattenleber-NAD-Kinase

Die NAD-Kinase benötigt zur Synthese von NADP energiereiches Phosphat, das in der Regel aus ATP gewonnen wird. Doch war es interessant zu erfahren, ob eine Phosphorylierung des NAD auch durch UTP und GTP möglich ist. In den Standardinkubationsansätzen wurde ATP durch UTP oder GTP ersetzt und die gebildete NADP-Menge ermittelt. Unter den gewählten Bedingungen konnte eine Phosphorylierung auch durch diese Nucleotide nachgewiesen werden, die jedoch deutlich geringer als mit ATP ausfiel.

Tabelle 2

Nucleotid µmol/5 ml	gebildete Menge von NADP in mol/mg Prot./Std.
ATP 29,7	$1,56 \cdot 10^{-7}$
UTP 31,0	$0,44 \cdot 10^{-7}$
GTP 28,8	$0,28 \cdot 10^{-7}$

Diese Ergebnisse unterscheiden sich von denen YEROs (42), der verschiedene Triphosphate u.a. auch UTP und GTP zur Phosphorylierung heranzog und nur für dATP eine Phosphatübertragung nachweisen konnte. Da in seiner Publikation keine Konzentrationen für die energiereichen Phosphate angegeben sind, ist es denkbar, daß die Versuche mit zu niedrigen Konzentrationen durchgeführt wurden. In neueren Untersuchungen konnte APPS (2) an der Taubenleber durch Zusatz von Mn^{++} und Zn^{++} als aktivierende Ionen, die die Michaeliskonstante für ATP senken, eine Phosphorylierung des NAD durch CTP, GTP, ITP und UTP nachweisen.

II. Phosphorylierung von NAD in Anwesenheit der Antimetaboliten 3-AP, 6-AN und der Analogen 3-APAD, 6-ANAD und Thio-NAD

1963 untersuchte VON BRUCHHAUSEN (5) in vitro den Einfluß von Antimetaboliten und NAD-Analogen auf Phosphokinasen wie die Pyruvatkinase und Kreatinphosphokinase des Kaninchenmuskels. Er fand bei Zusatz von 6-ANAD 10^{-3}M eine Hemmung der durch diese Fermente katalysierten Phosphorylierung von ADP zu ATP um ca. 40 %. Unter den gleichen Versuchsbedingungen blieben bei Zusatz von 3-APAD und der Base 6-AN 10^{-3}M die enzymatischen Reaktionen unbeeinflußt.
Ein Jahr später beschrieben COPER und NEUBERT (15) den Einfluß dieser Substanzen auf eine Phosphokinase, deren Reaktion in der Bildung von NADHP und Transphosphorylierung zu ATP bestehen soll. Während durch Zusatz der Analogen 3-APAD und 6-ANAD eine Hemmung des Enzyms auftrat, verlief die Reaktion bei Zugabe von 4-APAD sowie der Basen 3-AP, 4-AP und 6-AN ungestört. Da auch die NAD-Kinase zu den Phosphokinasen gehört, lag es nahe zu untersuchen, welchen Einfluß die bekanntesten Antimetaboliten des NA und die entsprechenden NAD-Analogen auf die Synthese von NADP aus NAD ausüben und ob 3-APAD, 6-ANAD und Thio-NAD als Substrat der NAD-Kinase verwendet werden.

1. 3-AP und 6-AN

Den Standardinkubationsansätzen wurden die Basen 3-AP und 6-AN in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-2}$M zugesetzt. In mehreren Versuchen (n = 4) blieb die NADP-Synthese durch 3-AP Zusatz unbeeinflußt, während sie durch Zugabe von 6-AN um ca. 20 % gehemmt wurde (Abb. 4). Bei niederen Konzentrationen von 6-AN blieb die NAD-Synthese ungestört.

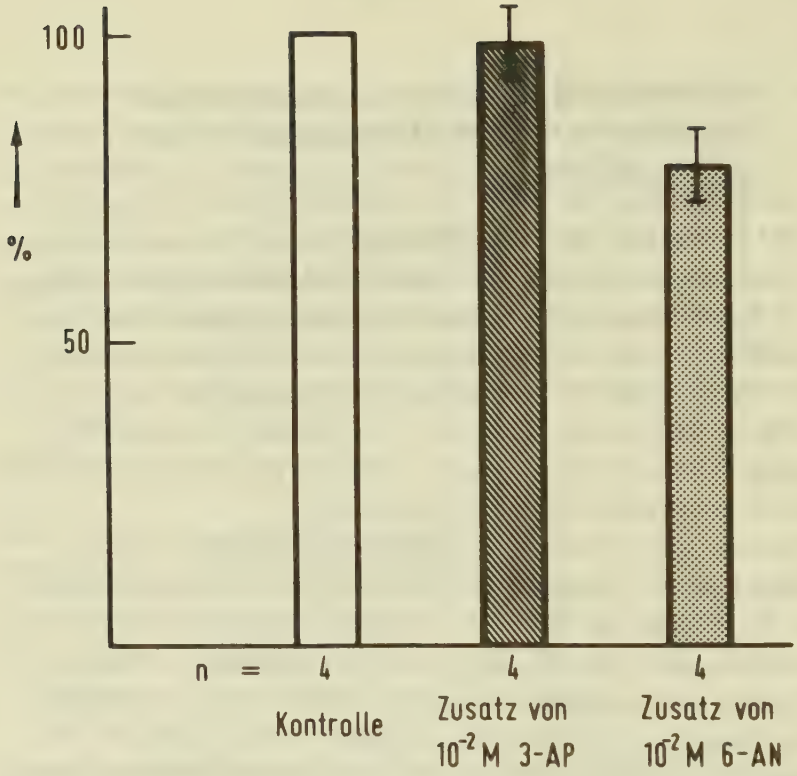
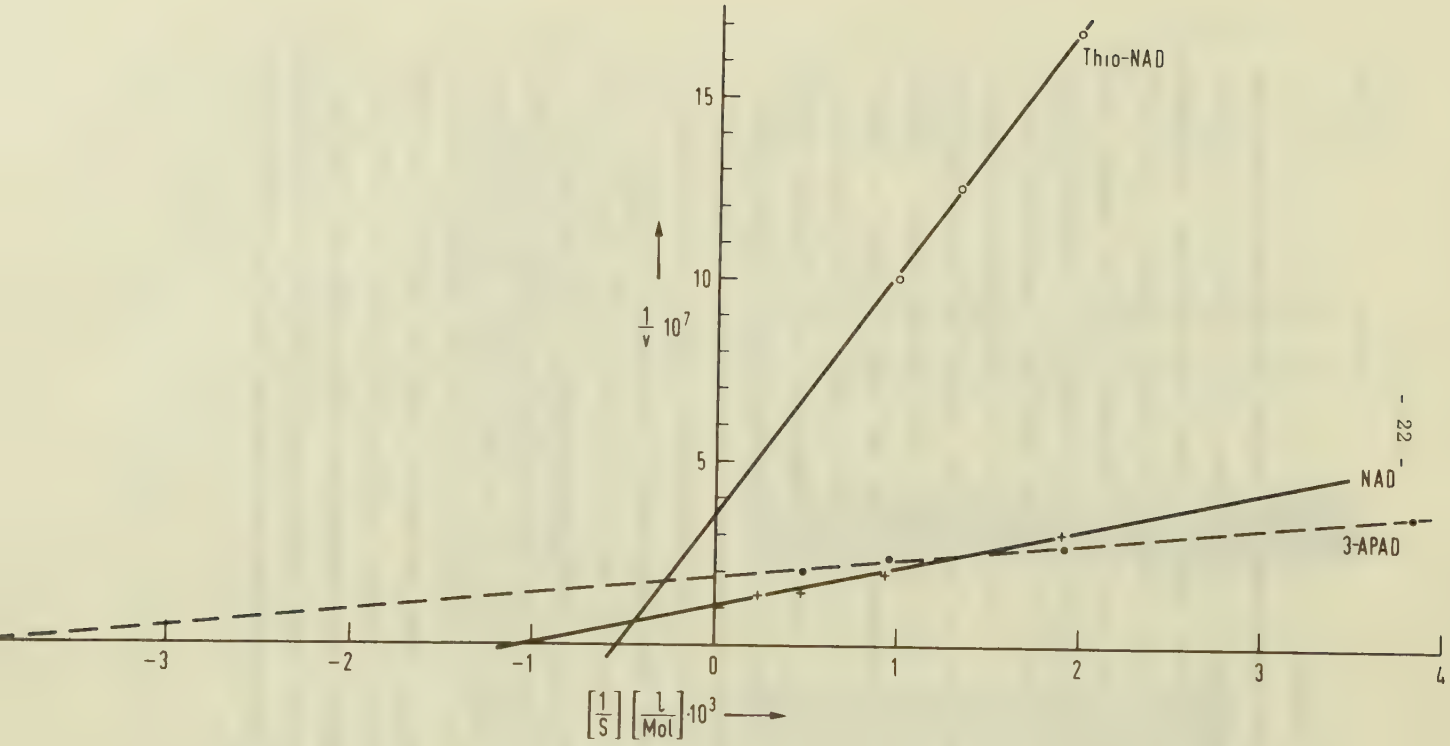


Abb. 4 NADP Bildung in Anwesenheit von 3-AP und 6-AN ausgedrückt in % der Werte ohne Zusatz der Pyridinbasen. (Standardinkubationsansatz)

2a. 3-APAD

Zunächst sollte untersucht werden, ob das Analoge durch das Ferment phosphoryliert werden kann. 3-APAD (7,8 mM) und ATP (4,9 mM) wurden mit dem Enzym inkubiert. Die gebildete Menge 3-APADP betrug - bei 400 mμ gemessen - $1,3 \cdot 10^{-7}$ mol/mg Prot./Std.. Zum Vergleich ist die mit diesem Extrakt und einer äquimolaren Konzentration NAD synthetisierte NADP-Menge $1,48 \cdot 10^{-7}$ mol/mg Prot./Std.. Nach diesem positiv verlaufenen Vorversuch wurde die Reaktionsgeschwindigkeit der NAD-Kinase mit 3-APAD als Coenzym bei konstantem ATP-Gehalt - aber verschiedenen 3-APAD-Konzentrationen - bestimmt und die Versuchsergebnisse mit denen verglichen, bei denen die NAD-Konzentration variiert wurde. Aus der graphischen Darstellung von 1/V in Abhängigkeit von 1/S nach der Methode von Lineweaver und Burk ließen sich die K_m-Werte und das Verhältnis der maximalen Geschwindigkeiten bei Inkubation mit NAD und dem Analogen entnehmen (Abb. 5). K_m beträgt für 3-APAD unter den gewählten Bedingungen 0,25 mM und liegt etwas unter dem des NAD (0,93 mM). $\frac{V_{max\ 3\text{-APAD}}}{V_{max\ NAD}} = 0,56$. Ferner wurden Kombinationsversuche mit beiden Substraten durchgeführt. Den Standardinkubationsansätzen wurde 3-APAD in steigender Konzentration von 0,26 bis 1,56 mM zugesetzt. Da NADP und 3-APADP bei 340 mμ die gleiche spezifische Extinktion haben, bei 400 mμ jedoch nur 3-APADP absorbiert, wird durch Messung bei 340 mμ die Summe von NADP und 3-APADP, durch Messung bei 400 mμ allein der Gehalt an 3-APADP erfaßt. Durch Subtraktion der bei 400 mμ gemessenen 3-APADP-Menge läßt sich dann der Anteil des NADP berechnen.



5 Bestimmung der Michaeliskonstanten der Substrate NAD 3-APAD und Thio-NAD für Rattenleber-NAD-Kinase

Beispiel eines typischen Versuchs:

NAD mM	Zusatz v. 3-APAD mM	NADP + synthetisierte Menge 3-APADP (10^{-7} mol/mg Protein/Stunde	3-APADP	NADP).
7,8	0,00	1,28	0,00	1,28
7,8	0,26	1,35	0,07	1,28
7,8	0,52	1,43	0,27	1,16
7,8	0,78	1,52	0,58	0,94
7,8	1,04	1,62	0,72	0,90
7,8	1,30	1,77	0,91	0,86
7,8	1,56	1,87	1,14	0,73

Gegenüber dem Kontrollversuch ohne 3-APAD nimmt unter Zusatz steigender 3-APAD-Konzentration die NADP-Bildung ab. Sie beträgt bei einem Verhältnis des NAD zu 3-APAD von 10 : 1 73 %, von 5 : 1 57 %. In einem weiteren Versuch mit äquimolaren Konzentrationen von NAD und 3-APAD konnte über den gewählten Zeitraum kein NADP, sondern nur 3-APADP nachgewiesen werden. Nach diesen Befunden besitzt das Analoge offenbar eine höhere Affinität zum Enzym, d.h. bei gleichzeitigem Einsatz beider Substrate wird vorwiegend das Analoge an den Rezeptor gebunden und phosphoryliert. Unter der Annahme kompetitiver Hemmung - wie an der Taubenleber-NAD-Kinase von APPS (2) nachgewiesen - wurde die Hemmungskonstante nach der Methode von AUGUSTINSSON bestimmt. Sie beträgt unter den gewählten Bedingungen für 3-APAD: $K_i = 1,55 \cdot 10^{-3}$M.

2b. 6-ANAD

Da von Interesse war, ob auch eine Phosphorylierung des 6-ANAD durch die NAD-Kinase möglich ist, wurde versucht, das eventuell

gebildete 6-ANADP nachzuweisen. Dieses Analoge läßt sich durch keine Dehydrogenase reduzieren und ist damit spektrophotometrisch nicht von 6-ANAD zu differenzieren. Leider ist es mit den verwendeten chromatographischen Methoden nicht gelungen, die Bildung von 6-ANADP zu sichern. Dies liegt zum Teil daran, daß die zu erwartende 6-ANADP-Menge relativ klein ist, bzw. die im Inkubationsansatz vorhandenen anderen Nucleotide im Verhältnis zum synthetisierten 6-ANADP in sehr hoher Konzentration vorliegen. Auch die Bestimmung des Phosphatgehaltes ergab keine verwertbaren Resultate. Inzwischen ist YERO et al. (42), offenbar mit nicht näher beschriebenen anderen Methoden, die Phosphorylierung von 6-ANAD gelungen. Unabhängig von diesen Versuchen wurden unter den gleichen Bedingungen wie mit 3-APAD Kombinationsversuche mit NAD und 6-ANAD durchgeführt, indem den Standardinkubationsansätzen das Analoge in steigender Konzentration von 0,18 bis 1,08 mM zugesetzt wurde.

Beispiel eines typischen Versuchs:

NAD mM	6-ANAD Zusatz in mM	NADP, synthetisierte Menge in 10^{-7} mol/mg Prot./Std.
7,8	0,00	1,68
7,8	0,18	1,68
7,8	0,36	1,34
7,8	0,54	1,05
7,8	0,72	0,99
7,8	0,90	0,84
7,8	1,08	0,80

Wie aus dem Experiment hervorgeht, vermag auch dieses Analoge, die NADP-Bildung zu hemmen. Bei Einsatz von NAD und 6-ANAD

in einem Verhältnis von 10 : 1 beträgt die NADP-Bildung nur noch 59 %. Im Vergleich zu 3-APAD in gleicher Konzentration ist die Hemmung durch 6-ANAD etwas größer. Da auch für 6-ANAD eine kompetitive Hemmung gegenüber dem NAD anzunehmen ist, wurde nach der von Augustinsson ausgearbeiteten Methode die Hemmungskonstante bestimmt. In Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors wurde der Wert V/V' graphisch dargestellt. Aus dem Anstieg der Geraden, dem K_m-Wert und der Substratkonzentration des NAD ließ sich die Hemmungskonstante bestimmen. Sie beträgt unter den gewählten Bedingungen für 6-ANAD: $K_i = 1 \cdot 10^{-3}$ M.

2c. Thio-NAD

Analog den Versuchen mit 3-APAD und 6-ANAD wurde zunächst die Phosphorylierung des Thio-NAD untersucht. Im Vergleich zu den bisher verwendeten Standardinkubationsansätzen enthielten die im Folgenden beschriebenen Experimente weniger Thio-NAD und entsprechend auch weniger NAD. Daher wird die absolut gebildete Menge NADP bzw. Thio-NADP auch geringer.
Nach Inkubation von 0,54 mM Thio-NAD mit 6,2 mM ATP betrug die synthetisierte Thio-NADP-Menge $0,08 \cdot 10^{-7}$ mol/mg Prot./Std., die mit dem gleichen Extrakt und einer äquimolaren Konzentration NAD gebildete NADP-Menge liegt bei $0,33 \cdot 10^{-7}$ mol/mg Prot./Std.. Durch Variieren der Thio-NAD-Konzentration bei gleichbleibender, wie ✳ ATP-Konzentration ließen sich durch graphische Darstellung im 1/V - 1/S-Diagramm K_m und V_{max} dieses Analogen bestimmen (Abb. 5). Unter den gewählten Bedingungen beträgt K_m für Thio-NAD 1,66 mM und das Verhältnis $\frac{V_{max}\ \text{Thio-NAD}}{V_{max}\ \text{-NAD}} = 0,35$.
Verglichen mit dem physiologischen Coenzym NAD und dem Analogen 3-APAD wird für die halbmaximale Geschwindigkeit der Phosphorylierung von Thio-NAD zu Thio-NADP somit eine höhere Substrat-

✳ bei 2a verwendeter

konzentration benötigt. Wie für die beiden bereits beschriebenen Analogen 3-APAD und 6-ANAD tritt in Kombinationsversuchen mit NAD und Thio-NAD bei Zusatz steigender Thio-NAD-Konzentrationen von 0,25 bis 1,50 mM zum Standardinkubationsansatz eine Hemmung der NADP-Synthese ein.

Beispiel eines typischen Versuchs:

NAD mM	Thio-NAD Zusatz mM	NADP, synth. Menge in 10^{-7} mol/mg Prot./Std.	Thio-NADP
7,8	0,00	1,22	0,00
7,8	0,25	1,08	0,00
7,8	0,50	1,00	0,00
7,8	0,75	0,94	0,00
7,8	1,00	0,90	0,00
7,8	1,25	0,88	0,00
7,8	1,50	0,85	0,00

Bei Zusatz des Analogen in einem Verhältnis NAD/Thio-NAD von 10 : 1 beträgt die Hemmung ca. 23 %, bei einem Verhältnis von 5 : 1 ca. 30 %. Sie ist geringer als für 3-APAD und 6-ANAD. In diesem Versuch konnte keine sichere Thio-NAD-Bildung beobachtet werden. Die Berechnung der Hemmungskonstanten für Thio-NAD erfolgte ebenfalls unter der Annahme kompetitiver Hemmung wie sie von APPS (2) an der Taubenleber nachgewiesen wurde und beträgt unter den gewählten Bedingungen: $K_i = 2,2 \cdot 10^{-3}$ M. Sie ist damit größer als für 3-APAD und 6-ANAD.

DISKUSSION

Die NAD-Kinase Reaktion ist der bisher einzige bekannte Weg zur Synthese von NADP. Ihre Geschwindigkeit hängt nicht nur von der Konzentration der an ihr beteiligten Substrate NAD, ATP und der Mg^{++} ab, sondern wird auch von dem Gehalt an anderen physiologisch vorkommenden Verbindungen wie $NAD(P)H_2$ bestimmt, die an dieser Reaktion direkt nicht beteiligt sind (35, 37, 40). Daher könnte die auf diese Weise mehrfach kontrollierte Regulation der NADP-Synthese auch störanfälliger sein. Wir kennen heute eine größere Zahl sogar therapeutisch verwendeter Verbindungen, die zumindest in vitro fermentativ durch die NAD(P)-Glycohydrolase zu NAD(P)-Analogen synthetisiert werden (19, 25, 43). Um auf den ARPPR(P)-Rest der Pyridinnukleotide übertragen zu werden, müssen sie nicht einmal mit dem Nikotinamidteil des Coenzyms strukturverwandt sein. Als klassische Antimetaboliten mit der Eigenschaft, das Nikotinamid im NAD(P) verdrängen zu können, gelten das 3-AP und das 6-AN (7, 41). Während 3-AP bisher nur im Tierversuch verwendet wurde, ist 6-AN auch schon beim Menschen als Carcinostatikum benutzt worden (23, 38). Beide Antimetaboliten rufen nach einmaliger Gabe an Ratten nach verschieden langer Latenzzeit zahlreiche Effekte hervor, von denen sich nur wenige innerhalb der ersten 12 Stunden wieder zurückbilden. Dazu gehören vermehrtes Eindringen von Na-Ionen in die Zellen und durch verminderte tubuläre Rückresorption gesteigerte Elimination von Na^{+} (44). Zusätzlich tritt eine als Hyper- oder Hypoglycämie nachweisbare Störung im Kohlehydratstoffwechsel auf (6).

Diese Effekte beruhen wahrscheinlich nicht auf der Bildung der unphysiologischen Coenzyme, weil sie ihren Höhepunkt schon überschritten haben, bevor die Konzentration an Analogen ihr

Maximum erreicht hat. Zeitlich später kommt es dann zu vorwiegend neurologischen Veränderungen, die z. T. irreversibel sind (9).

Die Bildung der falsch strukturierten Pyridinnukleotide wird allgemein auf die geringe Spezifität der NAD(P)-Glycohydrolase zurückgeführt, wobei der prozentuale Anteil an NADP-Analogen regelmäßig wesentlich größer ist als an NAD-Analogen. Dieses Ungleichgewicht kann dadurch erklärt werden, daß in vitro die Konzentration an NA, die für die Hemmung der Hydrolyse des NADP benötigt wird, ca. 10mal geringer ist als für NAD (7). Die Aktivität der Transferase bleibt davon unbeeinflußt. Auf diese Weise kann bei hoher Konzentration des Antimetaboliten das NA im nicht hydrolysierten NADP weitgehend verdrängt werden. Im Gegensatz dazu reicht die bei der Hydrolyse von NAD entstehende Menge an NA nicht aus, um die Geschwindigkeit der Spaltung zu beeinflussen. Es kann deshalb auch kaum ein Austausch stattfinden.

Damit ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß zumindest ein Teil der NADP-Analogen durch Phosphorylierung der entsprechenden NAD-Verbindungen entstehen, zumal von APPS (2) und auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, daß die NAD-Kinase sowohl 3-APAD als auch 6-ANAD als Substrat verwerten kann. In vivo kann der Anteil an der NADP-Analogen-Bildung, der auf diesem Wege erfolgen könnte, allerdings nicht sehr erheblich sein, denn offenbar ist die Phosphorylierung der NAD-Analogen - wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß - mit einer Hemmung der Synthese des natürlichen NAD verbunden. Bei allen Versuchen, die mit einer Kombination von NAD mit 3-APAD, 6-ANAD oder auch Thio-NAD durchgeführt wurden, nimmt die Bildung von NADP ab. Schon bei einem Verhältnis von NAD zu 3-APAD von 10 : 1, wie es im Gehirn der Ratten bei der 3-AP-Vergiftung in vivo gefunden wurde, ist die Geschwindigkeit der

NADP-Synthese in vitro um knapp 30 % vermindert. Eine auffällige Abnahme der NADP-Konzentration bei der 3-AP-Vergiftung ist jedoch nicht beschrieben worden. Vielmehr trat 3-APADP zusätzlich auf (41). Nun ist allerdings die NADP und 3-APADP Menge im Rattengehirn relativ gering, so daß eine NADP-Abnahme um 10 oder 20 % kaum mit Sicherheit nachzuweisen sein dürfte. Deutlicher wird die Aussage nach einer Behandlung mit 6-AN, nach der in nahezu allen Organen 6-ANADP vorhanden ist (10, 13, 17, 22).
Auch hierbei bleibt der NADP-Gehalt der Gewebe weitgehend unverändert und 6-ANADP tritt nur zusätzlich auf. In der Leber ist z. B. nach 100 mg/kg 6-AN ungefähr gleichviel NADP wie 6-ANADP vorhanden, (13). Wenn die NADP-Analogenbildung auf dem Wege über die NAD-Kinase-Reaktion erfolgen würde, müßte sie zusätzlich und ohne Beeinträchtigung des normalen NADP-Umsatzes durchgeführt werden. Dies ist nach den erhaltenen Befunden aber nicht der Fall. Der 6-ANAD-Gehalt der Zellen beträgt zwischen 10 und 20 % des NAD. Dieses Mengenverhältnis reicht in vitro bereits aus, um die Synthese von NADP aus NAD um 40 % zu hemmen. Thio-NAD ist in den durchgeführten Untersuchungen weniger wirksam, läßt sich aber auch viel schlechter zu Thio-NADP phosphorylieren. Dagegen ist die Relation NADP zu Thio-NADP in vivo und in der Glycohydrolase-Reaktion in vitro sehr ähnlich der von NADP zu 3-APADP bzw. 6-ANADP.
Die Frage, in welchem Umfang NADP-Analoge in vivo durch die NAD-Kinase-Reaktion synthetisiert werden, wird demnach endgültig erst mit Verbindungen zu klären sein, die mit der Glycohydrolase nicht reagieren, aber auf dem Wege der de novo Synthese entstehen.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende 2 Fragen untersucht:

1. Wird die Geschwindigkeit der NAD-Kinase-Reaktion, die die Synthese von NADP aus NAD katalysiert, durch die Nicotinamid-Antimetaboliten 3-Acetylpyridin und 6-Aminonikotinamid beeinflußt?

2. Werden die NAD-Analogen 3-APAD, 6-ANAD und Thio-NAD von der NAD-Kinase als Substrat verwendet und verändert ihre Anwesenheit die Geschwindigkeit der unter Standardbedingungen ablaufenden Reaktion?

Um die Versuche unter optimalen Bedingungen durchführen zu können, wurden zunächst einige Eigenschaften der NAD-Kinase der Rattenleber bestimmt. Das pH-Optimum der Reaktion lag zwischen 7,4 und 7,6. Die K_m-Werte betragen für NAD 0,93 mM und für ATP 1,2 mM. Bei hoher ATP-Konzentration (12,24 mM) trat eine Hemmung der Fermentaktivität auf. Der Hemmungstyp konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die energiereichen Triphosphate UTP und GTP werden vom Ferment als Phosphatdonatoren verwendet. Im Vergleich zum ATP verlief die Reaktion jedoch langsamer.

Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde unter standardisierten Bedingungen die Phosphorylierung von NAD in Anwesenheit der Antimetaboliten 3-AP, 6-AN und der Analogen 3-APAD, 6-ANAD und Thio-NAD untersucht.

1. Bei Zusatz von 3-AP bis zu 10^{-2} M blieb die NADP-Synthese unbeeinflußt, während sie durch 6-AN in der höchsten Konzentration um ca. 22 % gehemmt wurde.

2. a) 3-APAD wird durch die NAD-Kinase phosphoryliert. Der K_m-Wert betrug 0,25 mM, das Verhältnis $\frac{V_{max}\ 3\text{-APAD}}{V_{max}\ NAD} = 0,56$.
In Kombinationsversuchen mit NAD und Zusatz von 3-APAD in steigender Konzentration trat eine Hemmung der NADP-Synthese auf, die bei einem Verhältnis des NAD/3-APAD von 10 : 1 bei 73 %, von 5 : 1 bei 57 % lag. Gleichzeitig nahm die gebildete 3-APADP-Menge kontinuierlich zu. Nach diesen Befunden besitzt das Analoge offenbar eine höhere Affinität zum Enzym als das physiologische Substrat. Der K_i für 3-APAD wurde unter der Annahme einer kompetitiven Hemmung mit $1,55 \cdot 10^{-3}$ M errechnet.

b) Analog den Versuchen mit 3-APAD sollte auch die Phosphorylierung von 6-ANAD untersucht werden. Mit den verwendeten chromatographischen Methoden gelang es jedoch nicht, die Synthese von 6-ANADPdurch die NAD-Kinase zu sichern.
In Kombinationsversuchen mit NAD und 6-ANAD in steigender Konzentration trat eine Hemmung der NADP-Bildung auf. Bei einem Verhältnis NAD/6-ANAD von 10 : 1 wurden nur noch 59 % zu NADP phosphoryliert. Unter der Annahme kompetitiver Hemmung liegt K_i bei $1 \cdot 10^{-3}$ M.

c) Thio-NAD ließ sich wie 3-APAD durch die NAD-Kinase phosphorylieren. K_m betrug 1,66 mM, das Verhältnis $\frac{V_{max}\ \text{Thio-NAD}}{V_{max}\ NAD} = 0,35$.
Kombinationsversuche mit NAD und Thio-NAD in steigender Konzentration zeigten eine Hemmung der NADP-Synthese, die jedoch geringer als mit 3-APAD und 6-ANAD war (NAD/Thio-NAD von 10 : 1 ca. 23 %, von 5 : 1 ca. 30 %). K_i liegt unter der Annahme kompetitiver Hemmung bei $2,2 \cdot 10^{-3}$ M.

A B K Ü R Z U N G E N

NA	Nicotinsäureamid
3-AP	3-Acetylpyridin
4-AP	4-Acetylpyridin
6-AN	6-Aminonicotinamid
NAD	Nicotinamidadenindinucleotid
NADP	Nicotinamidadenindinucleotidphosphat
$NAD(P)H_2$	reduziertes NAD(P)
NADH P	phosphoryliertes NADH
ARPPR	Adenosin-5-diphosphatribose
ARPPR(P)	Adenosin-5-diphosphatribose-2'-phosphat
3-APAD	3-Acetylpyridinadenindinucleotid
3-APADP	3-Acetylpyridinadenindinucleotidphosphat
4-APAD	4-Acetylpyridinadenindinucleotid
6-ANAD	6-Aminonicotinamidadenindinucleotid
6-ANADP	6-Aminonicotinamidadenindinucleotidphosphat
Thio-NAD	Thionicotinamidadenindinucleotid
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
UTP	Uridintriphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Gl-6-ph.	Glucose-6-phosphat
M; mM	molar; millimolar
mol; µmol	Mol; Mikromol

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. APPS, D.K.: Kinetic Studies of Pigeon Liver NAD Kinase. Europ. J. Biochem. 5, 444 (1968)

2. APPS, D.K.: The Substrate Specificity of Pigeon Liver NAD Kinase. Europ. J. Biochem. 7, 260 (1969)

3. AUGUSTINSSON, K.B.: Acta Physiol. Scand. 15 Suppl. 152 (1948), zitiert in R.B. BARLOW: "Introduction to Chem. Pharmacology", 2. Ausgabe, London 1964

4. BERENBLUM, I., E. CHAIN: An improved method for the colorimetric determination of phosphate. Biochem. J. 32, 295 (1958)

5. BRUCHHAUSEN, F. v.: Hemmung von Phosphokinasen durch das 6-Aminonicotinamid-Analoge (6-ANAD) des Nicotin-Adenin-Dinucleotids (NAD). Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 247, 87 (1964)

6. BRUCHHAUSEN, F. v.: Zum Mechanismus der Hyperglykämie bei der 6-Aminonicotinamid-Vergiftung der Ratte. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 250, 241 (1965)

7. BRUNNEMANN, A., H. COPER: Vergleichende Untersuchungen über die Biosynthese der NAD(P)-Analogen des 3-Acetylpyridins, 4-Acetylpyridins, 6-Aminonicotinamids und Isonicotinsäurehydrazids. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 248, 514 (1964)

8. BRUNNEMANN, A., H. COPER: Hydrolyse von NAD(P) und Biosynthese von 3-APAD(P) durch Hirnmikrosomen verschiedener Tierarten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 250, 469 (1965)

9. BRUNNEMANN, A., H. COPER, H. HERKEN: Isolierung von 3-Acetylpyridin-Adenindinucleotid (3-APAD) aus dem Gehirn 3-Acetylpyridin-vergifteter Ratten.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 244, 223 (1962)

10. BRUNNEMANN, A., H. COPER, D. NEUBERT: Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonicotinamid-Adenindinucleotids (6-ANAD).
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 246, 437 (1964)

11. CHRIST, W.: Pharmakologische und biochemische Eigenschaften des Thionicotinamids (Thio-NA) und seiner NAD(P)-Analogen.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 260, 102 (1968)

12. COLOWICK, S.P., N.O. KAPLAN: Methods of Enzymology. Acad. Press, N.Y., 1, 34 (1955)

13. COPER, H., H. HADASS, H. LISON: Untersuchungen zum Mechanismus zentralnervöser Funktionsstörungen durch 6-Aminonicotinamid.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 225, 97 (1966)

14. COPER, H., D. NEUBERT: Reaktionsgeschwindigkeit NADP-Abhängiger Oxydoreduktasen aus Rattengehirn mit 3-Acetylpyridin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat.
J. of Neurochemistry 10, 513 (1963)

15. COPER, H., D. NEUBERT: Effect of 6-amino NAD and other NAD analogues on the formation of NADH P and its transphosphorylation to ATP.
Biochim. Biophys. Acta 82, 167 (1964)

16. COPER, H., D. NEUBERT: Einfluß von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit einiger NADP-Bedürftiger Oxydoreduktasen.
Biochim. Biophys. Acta 89, 23 (1964)

17. DIETRICH, L.S., J.M. FRIEDLAND, L.A. KAPLAN: Pyridine nucleotide metabolism. Mechanism of reaction of the niacin antagonist 6-Amino-nicotinamide.
J. Biol. Chem. 233, 964 (1958)

18. FERNANDES, M.: Die NAD-Kinasen des Gehirnes und der Leber der Ratte und ihre Beeinflussung durch Pharmaka in vitro.
Inaugural-Dissertation (1969)

19. FISCHER, M.: Untersuchungen über die Spezifität von Nukleosidase-Enzymen.
Inaugural-Dissertation (1964)

20. HANDLER, P., J.R. KLEIN: The inaktivation of pyridine nucleotides by animal tissues in vitro.
J. Biol. Chem. 143, 49 (1942)

21. HERKEN, H., V. NEUHOFF: Mikroanalytischer Nachweis von Acetylpyridin-adenin-dinucleotid und Acetylpyridin-adenin-dinucleotid-phosphat im Gehirn.
Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem. 331, 85 (1963)

22. HERKEN, H., V. NEUHOFF: Spektrofluorometrische Bestimmung des Einbaues von 6-Aminonicotinsäureamid in die oxydierten Pyridinnucleotide der Niere.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 247, 187 (1964)

23. HERTER, F.P., S.G. WEISSMAN, H.G. THOMPSON, G. HYMAN, D.S. MARTIN: Clinical Experience with 6-Aminonicotinamide.
Cancer Res. 21, 31 (1961)

24. HOLIDAY, E.R., E.A. JOHNSON: Location of paper chromatogramm spot of purine and pyrimidine derivates in ultra-violet light.
Nature 163, 216 (1948)

25. JÜTTE, R.: Untersuchungen über die NAD(P) Glycohydrolase aus Tuberkulosebakterien. Ein Beitrag zum Wirkungsmechanismus des INH.
Inaugural-Dissertation (1967)

26. KAPLAN, N.O., S.P. COLOWICK, A. NASON: Neurospora diphosphopyridine nucleosidase.
J. Biol. Chem. 191, 473 (1951)

27. KORNBERG, A.: Enzymatic Synthesis of Triphosphopyridine Nucleotide.
J. Biol. Chem. 182, 805 (1950)

28. LINEWEAVER, H., P. BURK: The Determination of Enzyme Dissociation Constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 (1934)

29. LOWRY, N.O., N.I. ROSEBROUGH, A.L. FARR, P.J. RANDALL: Protein Measurement with the Folinphenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951)

30. MANN, O.J.G., J.H. QUASTEL: Nicotinamide, Cozymase and Tissue Metabolism.
Biochem. J. 35, 502 (1941)

31. MARKHAM, R., I.D. SMITH: Chromatographic Studies of Nucleic Acids.
Biochem. J. 45, 294 (1949)

32. McILWAIN, H.: Properties of Preparations from the Central Nervous System which degrade Coenzyme I and II, their Connexion with Carbohydrate Metabolism.
Biochem. J. 46, 612 (1950)

33. MICHAELIS, L., M.L. MENTEN: Die Kinetik der Invertinwirkung. Biochem. Z. 49, 333 (1913)

34. NEMCHINSKAYA, V.L.: The Intracellular Localisation of Synthesis of Nicotinamide-Adenine-Dinucleotide-Phosphate.
Biochem. 28, 694 (1963) übersetzt von Biokhimya 28, 951 (1963)

35. OKA, H., J.B. FIELD: Inhibition of Rat Liver Nicotinamide Adenine Dinucleotide Kinase by Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate.
J. Biol. Chem. 243, 815 (1968)

36. ORGANIKUM - BERLIN 1964, S. 140

37. PASTAN, J., P. JOHNSON, E. KENDIG, J.B. FIELD: Pyridine Nucleotides in the Thyroid.
J. Biol. Chem. 238, 3366 (1963)

38. PERLIA, C.P., S. KOFMAN, H. SKY-PECK, S.G. TAYLOR: Clinical Use of 6-Aminonicotinamide in Patients with Disseminated Neoplatic Disease.
Cancer 14, 644 (1961)

39. RAPPOPORT, S.M.: Medizinische Biochemie, S. 269, 485, 511

40. WANG, T.P., N.O. KAPLAN: Kinases for the Synthesis of Coenzyme A and Triphosphopyridine Nucleotide. J. Biol. Chem. 206, 311 (1954)

41. WILLING, F., V. NEUHOFF, H. HERKEN: Der Austausch von 3-Acetylpyridin gegen Nicotinsäureamid in den Pyridinnucleotiden verschiedener Hirnregionen. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. u. Pharmak. 247, 254 (1964)

42. YERO, I.L., B. FARINAS, L.S. DIETRICH: The Purification and Properties of Rat Liver Nicotinamide Adenine Dinucleotide Kinase. J. Biol. Chem. 243, 4885 (1968)

43. ZATMAN, L.J., N.O. KAPLAN, S.P. COLOWICK, M.M. CIOTTI: Effect of Isonicotinic Acid Hydrazideon Diphosphopyridine Nucleotidase. J. Biol. Chem. 209, 453 (1954)

44. ZEMISCH, B.: Störungen des Elektrolyt- und Wasserhaushalts nach Bildung abnorm strukturierter NAD- bzw. NADP-Analoga. Inaugural-Dissertation (1964)

LEBENSLAUF

Am 26. 7. 1938 wurde ich als Tochter des Max Nieling und seiner Ehefrau Margarete, geb. Eckhardt in Brandenburg/Havel geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule wurde ich in die Theodor-Neubauer-Oberschule aufgenommen und bestand hier 1956 die Reifeprüfung. Da ich keine Zulassung zum Medizinstudium erhielt, begann ich eine Lehre, die ich 1958 als Industriekaufmann abschloß.

Nach erneuter Ablehnung zum Studium zog ich im gleichen Jahr nach West-Berlin und absolvierte hier 1959 erfolgreich den Lehrgang für Ostabiturienten. Anschließend begann ich an der Freien Universität das Studium der Medizin. Bis zum Physikum studierte ich an dieser Universität. Nach weiteren Studien an der Universität Hamburg kehrte ich nach Berlin zurück und beendete 1965 das Studium mit dem Medizinischen Staatsexamen. Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich auch am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin tätig. Dort begann ich meine Doktorarbeit, die ich am Institut für Neuropsychopharmakologie beendete.

Seit Juni 1968 bin ich Assistentin im Kinderkrankenhaus Am Mariendorfer Weg in Berlin.

Druck: Dissertationsdruckstelle, 1 Berlin 33